УДК: 619:616.98:578.825.1:616-097.3

А.А. Пяткина, Ш.К. Куляшбекова, А.Э. Меньщикова, А.В. Борисов
ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ЦЫПЛЯТ НА ВИРУС ГЕРПЕСА ИНДЕЕК

Введение

Болезнь Марека (БМ) в настоящее время продолжает оставаться серьезной проблемой для промышленного птицеводства. Единственным средством борьбы с данным заболеванием служит вакцинопрофилактика. Публикации, посвященные поствакцинальному иммуногенезу против вируса БМ [13] весьма обширны, однако, в большинстве основаны на сложных методах исследований и имеют академическую направленность, что ограничивает их практическое использование.

Целью настоящей работы являлось изучение динамики поствакцинальной реакции иммунокомпетентных клеток и интенсивности антителообразования, установленных посредством более доступных методов. Кроме этого определяли корреляцию между оценками клеточного и гуморального иммунных ответов. Исследования проводили на птицах, иммунизированных вакциной против БМ на основе вируса герпеса индеек.

Материалы и методы

Вирус. Вакцинный штамм «Владимир» вируса герпеса индеек (ВГИ) депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве. Регистрационный номер штамма «Владимир» №124-Деп» (ФГУ «ВГНКИ», г. Москва). Штамм культивировали на первичной культуре клеток куриных фибробластов (КФ) из СПФ-эмбрионов.

Антигенсодержащий материал готовили путем дезинтеграции инфицированных клеток КФ, суспензию которых при 0÷4 °С обрабатывали ультразвуком с частотой 20 кГц. Далее проводили двукратный цикл замораживания-оттаивания, с последующим фильтрованием [1; 9].

Подопытная птица. Клинически здоровые СПФ-цыплята и цыплята-бройлеры кросса «Смена-7» в возрасте одних суток. Вышедших из экспериментов живых птиц подвергали эвтаназии воздействием паров хлороформа.

Реакция торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ). Наличие фактора торможения миграции лимфоцитов периферической крови [4] птиц исследовали в присутствии антигена ВГИ в прямом капиллярном варианте РТМЛ [6]. Реакцию оценивали под оптическим микроскопом. Используя окулярную измерительную шкалу, определяли протяженность зоны миграции в контроле (Lo) и опыте (L), на основе которых вычисляли индекс миграции (ML) по формуле ML=(Lo-L)/Lo.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Титры антител в сыворотках крови птиц исследовали в непрямом твердофазном варианте ИФА [8, 9, 10] на планшетах, с иммобилизованным антигеном ВГИ. Титром исследуемой сыворотки считали прогнозируемую величину ее разведения, оптический показатель которого совпадал с пороговой оценкой отрицательного контроля. Величину титра (Т) определяли по фиксированному разведению тестируемой сыворотки (1:200) на основании модели связи с S/P-показателем, имеющей вид lgT=2,1457 (lgS/P)+3,9933.

Обработка результатов экспериментов. Использовали общепринятые методы вычисления среднеквадратичных отклонений (±G) и стандартных ошибок (±m) средних значений выборок варьирующих переменных [7; 8]. Определяли количественные показатели связи зависимых переменных [2; 5; 7] в виде коэффициентов корреляции (r).

Результаты и обсуждение

Для экспериментов использовали 2 группы птиц: I – СПФ-цыплята (n=30); и II – цыплята-бройлеры (n=30). Обе группы в суточном возрасте были иммунизированы вирусвакциной из штамма «Владимир».

Изучали динамику поствакцинальной реакции иммунокомпетентных клеток птиц. В РТМЛ в присутствии антигена ВГИ исследовали наличие «фактора торможения миграции фагоцитирующих клеток». Данный фактор относится к лимфокинам и обеспечивает сосредоточение сенсибилизированных иммунокомпетентных клеток в зоне присутствия антигена.

Для оценки концентрации этого фактора использовали ML-индекс. С этой целью у цыплят обеих групп с 7 по 63 сутки после вакцинации, еженедельно отбирали

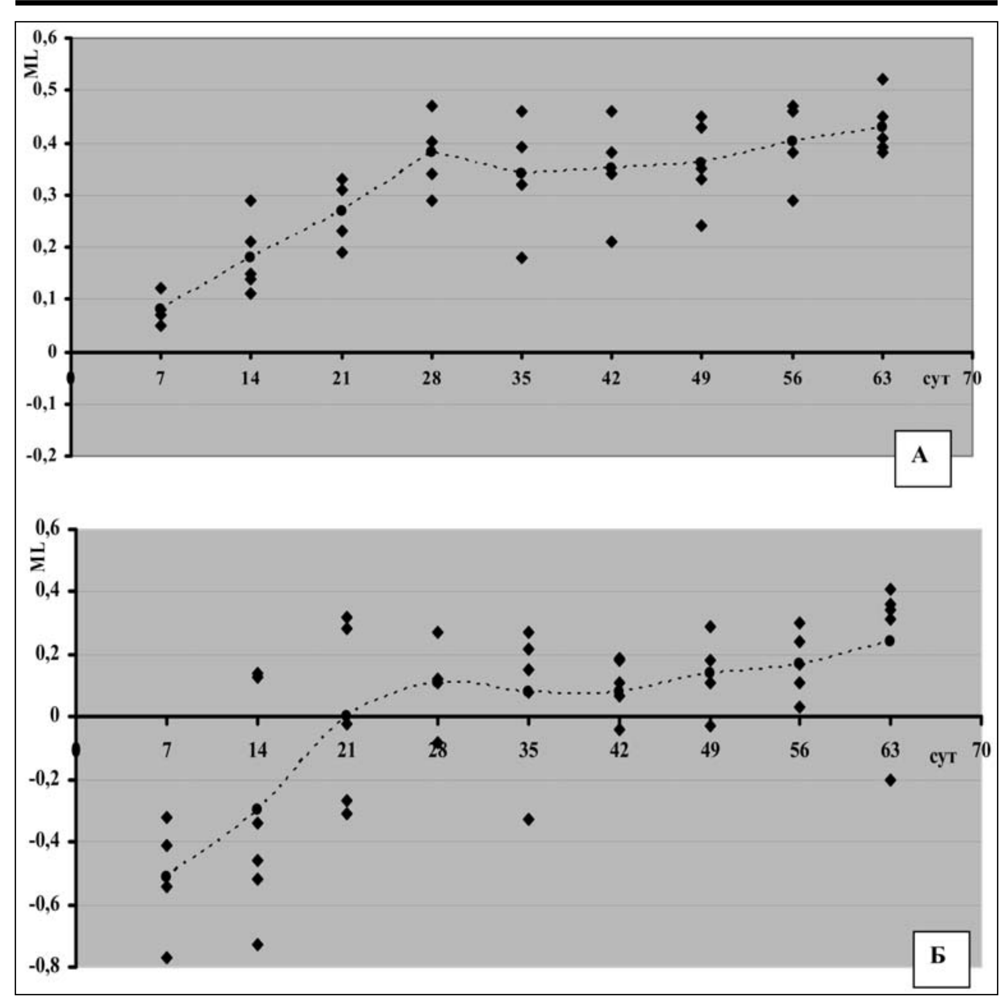


Рис.1. Динамика интенсивности РТМЛ у вакцинированных птиц
Распределение индексов миграции лимфоцитов (ML), установленных соответственно времени после вакцинации (сут) для СПФ-цыплят (А) и для цыплят-бройлеров (Б). Пунктиром показана средняя тенденция.

образцы гепаринизированной крови, в которых определяли значения ML-индексов. Полученные результаты в виде графиков представлены на рис.1.

Рис. 1А демонстрирует, что у СПФ-цыплят в интервале с 7 до 28 суток, средние индексы миграции (ML±G) возрастали от 0,08±0,03 до 0,38±0,09. Это означало, что на данном этапе происходило увеличение содержания антигенобусловленного фактора торможения клеточной миграции, т.е. развитие специфической реакции иммунокомпетентных клеток. Далее существенного возрастания индексов не отмечено, и до 63 суток средний показатель составлял значение ML±G=0,38±0,034. Очевидно, данный период стабилизации значений ML соответствовал фазе развитого состояния клеточного иммунитета.

Характер реакции иммунокомпетентных клеток цыплят-бройлеров (рис. 1Б) отличался от реакции СПФ-цыплят. С 7 по 28 сутки большинство ML-оценок находилось в отрицательной области, т.е. протяженность зоны миграции лимфоцитов в смеси с антигеном несколько превосходила соответствующий показатель их спонтанной диффузии (ML<0, при условии, если L>Lo). Возможно, что данный феномен был связан с образованием иммунных комплексов антигена с трансовариальными антителами, которые в этот период присутствовали в крови цыплят. Образованные комплексы могли воздействовать на состояние иммунокомпетентных клеток, например, активировать фагоцитарную функцию и влиять на подвижность гранулоцитов [3]. Очевидно, что на этой фазе специфический фактор торможения лимфоцитов отсутствовал.

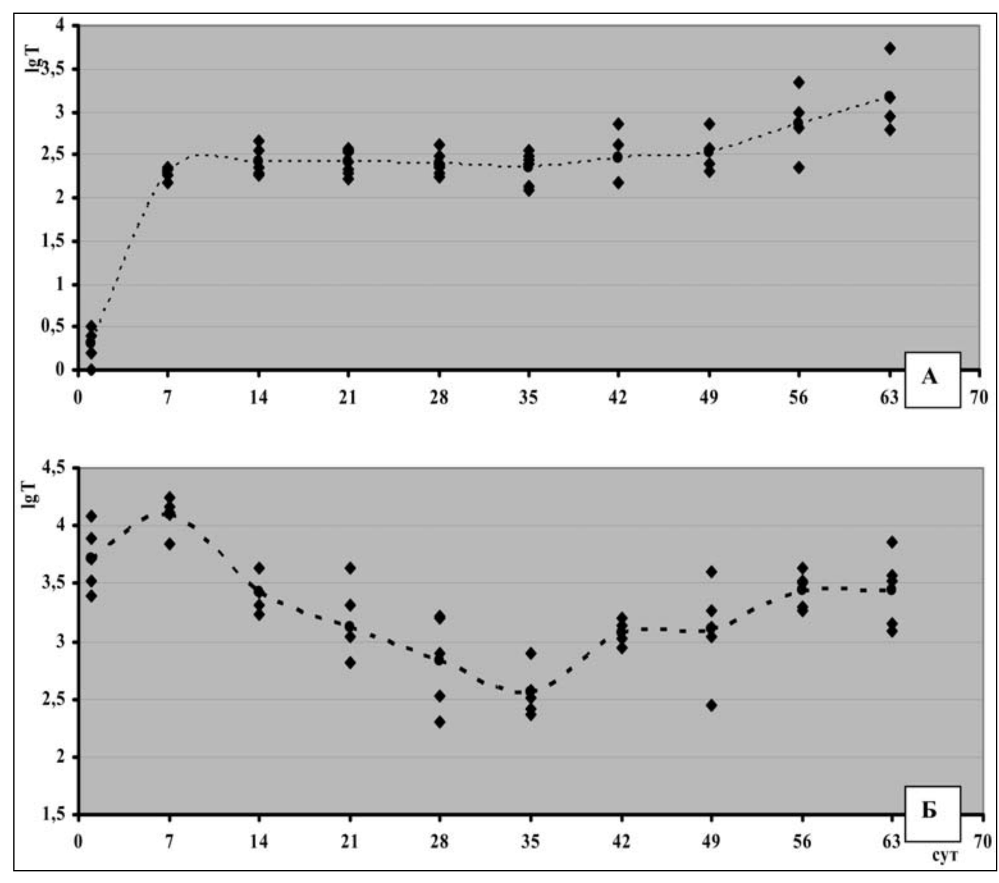


Рис. 2. Динамика поствакцинального гуморального иммунного ответа птиц в ИФА
Распределение логарифмических оценок титров сывороточных антител (lgT), установленных соответственно времени после вакцинации (сут) для СПФ-цыплят (А) и цыплят-бройлеров (Б). Пунктиром показано распределение средних значений.

Начиная с 28 суток, оценки ML-показателя, достигнув некоторого максимума, стремились к стабилизации значений. На этом этапе средний индекс (ML±G) составил величину ML±G=0,13±0,059. Вероятно, что вторая фаза изучаемого процесса отражала возникновение специфического иммунного ответа клеток на антиген ВГИ.

Исследовали динамику поствакцинального гуморального иммунного ответа птиц. Одновременно с оценкой реакции иммунных клеток в обеих подопытных группах цыплят изучали интенсивность антителообразования на ВГИ. С этой целью в образцах сывороток крови, которые отбирались еженедельно в период с 1 до 63 суток, в ИФА определяли титры антител. Соответствующие результаты графически представлены на рис. 2.

Рис. 2А иллюстрирует, что у СПФ-цыплят специфические антитела обнаруживались в образцах сывороток, начиная с 7 суток после вакцинации, при этом средняя оценка титра составила величину lgT±G=2,278±0,081 или в диапазоне данного отклонения 157≤T≤229. Далее, до 42 суток, оценки титров сохраняли свои значения и, в основном, находились в границах диапазона удвоенного среднеквадратичного отклонения (±0,162). Начиная с 49 суток, было отмечено возрастание концентрации антител, и на 63 сутки оценка титра, в среднем, составила значение lgT±G=3,160±0,364, или в диапазоне отклонения 625≤T≤3341.

У цыплят-бройлеров, распределение оценок титров по параметру времени (рис. 2Б) демонстрировало наличие двух максимумов, разделенных минимальным значением. В интервале с 1 по 7 сутки имел место максимум концентрации трансовариальных антител, средний титр которых составил значение lgT±G=3,934±0,229, или 5070≤T≤14554. Далее, до 35 суток, титры антител монотонно убывали до минимального среднего значения lgT±G=2,554±0,208,

или 222≤T≤578. Очевидно, что наблюдаемая регрессия показателей lgT была обусловлена выведением пассивно приобретенных антител, на фоне которых начало собственного гуморального иммунного ответа могло быть не обнаружено.

С 35 суток происходил устойчивый подъем значений титров, достигая второго максимума к 56 суткам, который соответствовал средней величине lgT±G=3,443±0,161, или 1914≤T≤4018, что характеризовало развитие поствакцинальной иммунной реакции птиц. До 63 суток (завершение эксперимента) титры сывороточных антител находились в диапазоне указанного среднеквадратичного отклонения достигнутого максимума.

На следующем этапе работы исследовали наличие связи между оценками активности антиген–зависимого фактора торможения миграции лимфоцитов (ML) и концентрацией сывороточных антител (lgT),установленных параллельно в заданные интервалы времени.

Для СПФ-цыплят (рис. 1А и рис. 2А) было установлено, что в период с 28 по 63 сутки коэффициент корреляции между показателями ML и lgT составил величину R±m=0,814±0,111. На этом основании сделали заключение, что во время развития поствакцинального иммунного ответа у СПФ-цыплят, антигензависимый фактор торможения миграции лимфоцитов возрастал одновременно с увеличением титров сывороточных антител.

Сопоставление соответствующих оценок ML и lgT у цыплят-бройлеров (рис. 1Б и рис. 2Б) показало наличие двух периодов, где формы связи между данными величинами были противоположны. На фазе падения титров материнских антител, продолжавшейся до 35 суток, со стороны иммунокомпетентных клеток в присутствии антигена наблюдали реакцию противоположную торможению. Данное явление считали неспецифической реакцией лимфоцитов на иммунные комплексы, образованные антигеном ВГИ с трансовариальными антителами. На данной фазе коэффициент корреляции исследуемых показателей составил отрицательную величину R=-0,875±0,093.

Период с 42 по 63 сутки после вакцинации бройлеров соответствовал фазе развития активного иммунного ответа. Между оценками титров антител и показателями ML прослеживалась явная положительная связь. Соответствующий коэффициент корреляции составил величину R=0,840±0,136. Полученные результаты позволили считать, что развитие поствакцинального иммунного ответа птиц в форме клеточной и гуморальной реакций происходило параллельно.

Выводы

1. Изучена динамика поствакцинальной реакции иммунокомпетентных клеток птиц в РТМЛ. Установлено, что к 28 суткам антигензависимый индекс миграции лимфоцитов для СПФ-цыплят составил величину ML±G=0,38±0,09, а для цыплят-бройлеров промышленного стада ML±G=0,13±0,059.

2. Исследована динамика напряженности поствакцинального гуморального иммунитета птиц в ИФА. Показано, что у СПФ-цыплят на 7 сутки средний титр антител составил величину 1:190 и к 63 суткам достигал значения 1:1445. У цыплят-бройлеров промышленного стада, имеющих на 7 сутки средний титр трансовариальных антител 1:8590, установили, что начало активного иммунного ответа приходилось к 35 суткам, что соответствовало титру 1:358, который к 56 суткам составил величину 1:2692.

3. Определены коэффициенты корреляции (R±m) между оценками РТМЛ и ИФА, которые на фазе развития активного иммунного ответа у СПФ-цыплят и цыплят-бройлеров составили значения 0,814±0,111 и 0,840±0,136, соответственно.

РЕЗЮМЕ

В динамике изучали реакцию иммунокомпетентных клеток и интенсивность антителообразования на вакцину против болезни Марека на основе вируса герпеса индеек (ВГИ). Использовали реакцию торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ), где определяли антигензависимый индекс миграции (ML), и твердофазный вариант непрямого ИФА, где определяли титр сывороточных антител (Т). Установили, что к 28 суткам индекс миграции у СПФ-цыплят составил значение ML±G=0,38±0,09, а у промышленных цыплят-бройлеров ML±G=0,13±0,059. При этом средний титр антител у СПФ-цыплят на 7 сутки был равен 1:190 и к 63 суткам достиг величины 1:1445. У цыплят-бройлеров, имеющих на 7 сутки средний титр трансовариальных антител 1:8590, установили, что начало активного иммунного ответа приходилось к 35 суткам, что соответствовало титру 1:358, который к 56 суткам составил величину 1:2692. Определены коэффициенты корреляции (R±m) между оценками РТМЛ и ИФА, которые на фазе развития активного иммунного ответа у СПФ-цыплят и цыплят-бройлеров составили значения 0,814±0,111 и 0,840±0,136, соответственно.

SUMMARY

The dynamics of the immunocompetent cell response and the intensity of creation of antibodies to Marek's disease vaccine on the basis of turkey herpesvirus were studied. The lymphocyte migration inhibition test for determination of antigen-induced migration level (ML) and indirect solid-phase immunosorbent assay for determination of serum antibody titre (T) were used. It was shown that by day 28 the migration level in SPF chicks was ML±G=0,38±0,09 and in commercial broiler chicks it was ML±G=0,13±0,059. Moreover, the antibody mean titre in SPF chicks was 1:190 by day 7 and 1:1445 by day 63. In broiler chicks with the mean titre of transovarian antibodies 1:8590 by day 7 it was demonstrated that the active immune response was induced by day 35 (titre 1:358); by day 56 the titre was equal to 1:2692. Coefficients of correlation (R±m) between lymphocyte migration inhibition test and indirect solid-phase immunosorbent assay were determined and at the phase of the development of active immune response in SPF chicks and broiler chicks they made up 0,814±0,111 and 0,840±0,136, correspondingly.

Литература

1. Гринин, А.С. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных / А.С Гринин, И.Н. Титов. М.: Колос, 1971. С. 31-40.
2. Закс, Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. М.: Статистика, 1976. 598 с.
3. Зуйкова, И.Н. Спектр цитокиновых дисфункций в генезе рецидивирующей герпесвирусной инфекции. Пути коррекции: автореф. дис… канд. мед. наук / И.Н. Зуйкова. М., 2007. 34 с.
4. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. С. 308-311.
5. Мисюк, Н.С. Корреляционно-регрессионный анализ / Н.С. Мисюк, А.С. Мастыкин, Г.П. Кузнецов. М.: Медицина, 1975. 192 с.
6. Оценка способности миграции лейкоцитов in vitro и продукции фактора, ингибирующего миграцию лейкоцитов крови у человека: метод. рекомендации / Т.Н. Крымкина, Л.В. Ганковская, Е.В. Соколова [и др.]. М., 1983. 43 с.
7. Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
8. Поллард, Дж. Справочник по вычислительным методам статистики / Дж. Поллард. М.: Финансы и статистика, 1982. 344 с.
9. Тихоненко, Т.И. Методические основы биохимии вирусов / Т.И. Тихоненко. М.: Медицина, 1973. С. 219-222.
10. Crowther, J.R. ELISA. Theory and practice. // Methods in Molecular Biology. Totowa, New Jersey, 1995. Vol. 64. P. 161-176.
11. Enzime immunoassay in diagnostic medical virology / E. Kurstak, P. Tijssen, C. Kurstak, R. Morisset // Bull. FAO. 1986. Vol. 64, № 3. P. 465-479.
12. Kemeny, D.M. An introduction to ELISA / D.M. Kemeny, S. Chantler // ELISA and Other Solid Phase Immunoassays. Chichester ets., 1988. P. 3-5.
13. Marek,s disease. An evolving problem / Ed. by F. Davison and V. Nair. London, Elsevier Acad. Press., 2004. 212 P.

УДК: 619:579.835:636.8

Э.И. Элизбарашвили, М.М. Рахманина, В.И. Уласов

ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ ВГНКИ)

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА У КОШЕК ПРИ СПОНТАННОМ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ

Инфекционный риинотрахеит кошек (ИРК) (Rhinotracheitis infectiosa feline) высококонтагиозная болезнь животных семейства кошачьих.

Впервые заболевание было установлено в США в 1957 году в группе котят 5–10-недельного возраста с признаками поражения респираторного тракта [3]. В России вирус инфекционного ринотрахеита кошек впервые был выделен нами в 1995 г. Установлена его роль в этиологии болезни [1].

Одной из задач, поставленных нами при многолетнем изучении особенностей проявлений этой инфекции – выявление зависимости тех или иных клинических признаков болезни от штамма (изолята) вируса.

Материалы и методы

Работа выполнялась в период с 1995 по 2008 год. Эпизоотический анализ, клинические исследования проводили на базе 9 ветеринарных клиник и 14 питомников кошек и зоопитомников городов Москвы, Волоколамска, Владимира, Дмитрова, Вязьмы, Одинцова, а также ОПХ «Манихино».

При клиническом обследовании более 200 животных учитывали анамнестические данные vitae (пол, возраст, условия содержания животных, наличие контактов и т.д.) и morbi (сроки наступления, порядок и характер проявления болезни)